

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-097401

(43)Date of publication of application : 11.04.1995

(51)Int.Cl.

C08B 37/08

A61K 9/00

A61K 47/36

C08B 37/00

(21)Application number : 05-268292

(71)Applicant : SHISEIDO CO LTD

(22)Date of filing : 29.09.1993

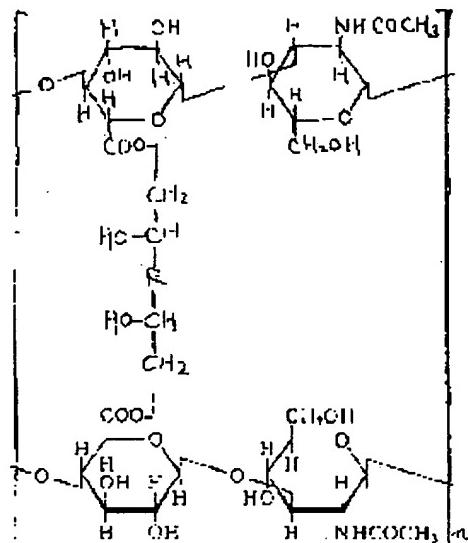
(72)Inventor : HARIKI TOSHIO  
YAMAGUCHI MICHIIRO  
ONO KIMIO  
UCHIDA MASARU

## (54) CROSSLINKED HYALUORONIC ACID, SUSTAINED-RELEASE PREPARATION, AND PLUG

## (57)Abstract:

**PURPOSE:** To obtain a water-insoluble, low-swelling, crosslinked hyaluronic acid for a sustained-release preparation and a plug by crosslinking the carboxyl groups of a hyaluronic acid residue with an epoxy-terminated crosslinking agent.

**CONSTITUTION:** The title acid is represented by the formula (wherein R is the residue of an epoxy crosslinking agent) and is formed by crosslinking the carboxyl groups of a hyaluronic acid residue with an epoxy-terminated crosslinking agent (e.g. diglycidyl ether or diglycidyl ester). The degree of crosslinking of the acid is desirably such that the content of the crosslinked carboxyl groups is 0.3% or above based on all the carboxyl groups of the hyaluronic acid. A sustained-release preparation is formed from a conjugate of the crosslinked hyaluronic acid with a medicine. A desirable example of the sustained-release preparation is an anticancer agent in which the medicine and the crosslinked hyaluronic acid form a conjugate through the ionic interaction of the carboxyl groups of the hyaluronic acid on the medicine. Further, a plug can be formed from the water-insoluble crosslinked hyaluronic acid.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 28.04.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3107488

[Date of registration] 08.09.2000

[Number of appeal against examiner's decision]

· Searching PAJ

2/2 ページ

· of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

08.09.2004

(19)【発行国】日本国特許庁(JP)

(12)【公報種別】公開特許公報(A)

(11)【公開番号】特開平7-97401

(43)【公開日】平成7年(1995)4月11日

(54)【発明の名称】架橋ヒアルロン酸、それを用いた徐放性製剤及び塞栓剤

(51)【国際特許分類第6版】 C08B 37/08 Z 7433-4C

¶6 A61K 9/00 F

¶7 47/36 C

¶8 C08B 37/00 G 7433-4C

【審査請求】未請求

【請求項の数】6

【出願形態】FD

【全頁数】12

(21)【出願番号】特願平5-268292

(22)【出願日】平成5年(1993)9月29日

(71)【出願人】

【識別番号】000001959

【氏名又は名称】株式会社資生堂

【住所又は居所】東京都中央区銀座7丁目5番5号

(72)【発明者】

【氏名】梁木 利男

【住所又は居所】神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地 株式会社資生堂第一リサーチセンター内

(72)【発明者】

【氏名】山口 道広

【住所又は居所】神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地 株式会社資生堂第一リサーチセンター内

(72)【発明者】

【氏名】大野 公男

【住所又は居所】神奈川県横浜市栄区上郷町262-32-5-306

(72)【発明者】

【氏名】内田 賢

【住所又は居所】東京都練馬区氷川台4-39-21-104

(74)【代理人】

【弁理士】

【氏名又は名称】岩橋 祐司

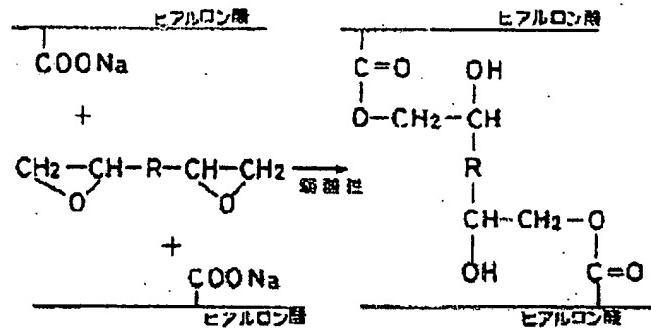
(57)【要約】

【構成】ヒアルロン酸残基のカルボキシル基が両末端エポキシ化合物系架橋剤により架橋された、下記一般式化1で示される架橋ヒアルロン酸及び該架橋ヒアルロン酸を担体とする徐放性製剤、塞栓剤。

【化1】なお、上記化1中、Rはエポキシ化合物系架橋剤の架橋残部である。

【効果】水不溶性及び低膨潤性とすることができます。

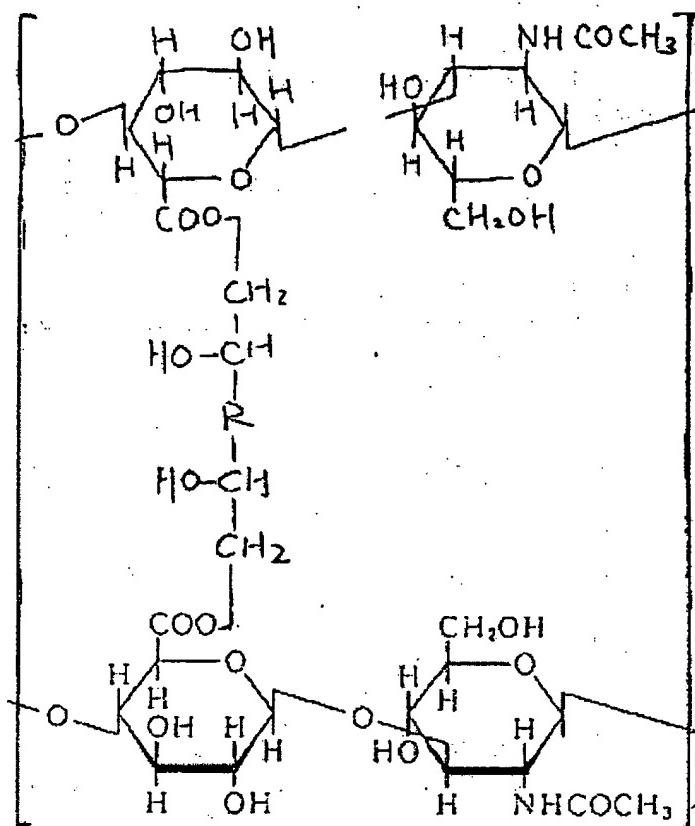
¶38



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】ヒアルロン酸残基のカルボキシル基が両末端エポキシ化合物系架橋剤により架橋された、下記一般式化1で示される架橋ヒアルロン酸。

【化1】



¶42 なお、上記化1中、Rはエポキシ化合物系架橋剤の架橋残部である。

【請求項2】請求項1記載の架橋ヒアルロン酸において、ヒアルロン酸の全カルボキシル基に対し、架橋されたカルボキシル基が0.3%以上である水不溶性で且つ低膨潤性の架橋ヒアルロン酸。

【請求項3】請求項1ないし2のいずれかに記載の架橋ヒアルロン酸と薬剤の複合体からなる徐放性製剤。

【請求項4】請求項3記載の徐放性製剤において、薬剤はヒアルロン酸のカルボキシル基とイオン的に相互作用し、複合体を形成し得る制癌剤であることを特徴とする徐放性製剤。

【請求項5】請求項2記載の架橋ヒアルロン酸からなる塞栓剤。

【請求項6】請求項5記載の塞栓剤において、ヒアルロン酸のカルボキシル基とイオン

的に相互作用する薬剤が複合化されたことを特徴とする塞栓剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は架橋ヒアルロン酸、それを用いた徐放性製剤及び塞栓剤、特にその架橋機構の改良に関する。

【0002】

【從来の技術】ヒアルロン酸は高分子量の生体内成分であり、生体適合性が高いことは無論、保水性等の機能性にも優れ、それ自体で化粧品等の分野に利用されるとともに、各種成分との複合体によりドラッグデリバリーシステムの担体等としても期待されている。一方、最近の制癌療法では制癌剤を癌患部周辺のみに分布させ、正常細胞への副作用を防止し、同時に樹脂等の高分子担体を用いて薬効の持続を図った投与方法や剤型の研究が盛んに行なわれている。患部周辺のみに長時間にわたって継続的に有効濃度の薬物を供給する、いわゆる徐放性局所投与方法として、例えば制癌剤をカプセル内に入れたり、錠剤に成型した製剤を癌患部の局所周辺に埋め込んだり、薬物内包マイクロスフィアを筋肉または血管内に注入し、局部血管を塞栓することで、閉塞された局部血管のみに薬物を浸出させる方法等が挙げられる。

【0003】從来、高分子被膜やマトリックスを微小球化し、薬物を徐放性にしたものとしては、エチルセルロースやワックスで製剤化したもの(特開昭54-163808)や、ポリ乳酸のマイクロカプセル化製剤(特開昭54-55717、特開昭59-33214)等、多数報告されている。ヒアルロン酸を薬剤の担体として用いたものにあっても、例えば特開昭62-129226や特開平1-156912等が知られている。また、ヒアルロン酸と制癌剤との組合せでは、ヒアルロン酸とアドリアマイシン(塩酸ドキソルビシン)との共有結合体等がPOLYMER PREPRINTS, JAPAN VOL142, No.3,898 (1993)等に報告されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、例えば微小球化した製剤を患部に投与した場合、投与初期の薬物放出速度が非常に高い傾向にあり、副作用を引き起こしたり、長時間にわたっての徐放性が得られない等、一定濃度で薬物を供給するという徐放効果を得ることは難しかった。また、薬剤の放出速度は、粒子の形状や粒径分布に敏感で、均一な形状と均一な粒子径が要求されていた。しかしながら、このような微小で均一な粒子を形成すること 자체が困難で、薬物放出速度の良好な制御を難しくしていた。また、ヒアルロン酸を担体として用いた徐放性製剤であっても、そのヒアルロン酸に薬剤を化学吸着ないし物理吸着させているのみでは、ヒアルロン酸が水溶性であることから、生体内でのヒアルロン酸の溶解に伴い薬剤が急激に放出されてしまい、やはり薬剤の徐放効果を適切に得ることは困難であった。

【0005】さらに、ヒアルロン酸とアドリアマイシンとの共有結合体の場合には、ヒアルロン酸が酵素分解されるまで薬剤が保持されるという利点はあるものの、合成に数ステップを要し、製造が繁雑であり、収率も低い等の難点があった。このように、微小球の徐放性製剤あるいはヒアルロン酸を利用した徐放性製剤には種々の難点が残されており、より好ましい薬理効果を引出す適切な製剤上の工夫が以前より望まれていた。このような課題を解決するものとして、例えば特開昭60-130601、特開昭61-138601等に記載される架橋ヒアルロン酸の利用が考えられる。しかしながら、架橋に用いられる物質は一般に生体内成分ではないため、その架橋物質の生体内での安全性にも注意を払わねばならず、この点でエポキシ化合物を用いたものが好ましい(Polymer Preprints, Japan Vol.142, No.3,938, 1993)。

【0006】エポキシ化合物を架橋剤として用いた架橋ヒアルロン酸としては、特開昭60-233101或いは特開昭61-164558に記載されたものなどがしられているが、これらは水溶性或いは水膨潤率が極めて大きいという課題があった。すなわち、生体内に架橋ヒアルロン酸が埋め込まれた場合、特に例えば特開昭63-281660に記載されるように血管内に塞栓剤として適用された場合等には、ある程度の膨潤性は必要なものの、あまり

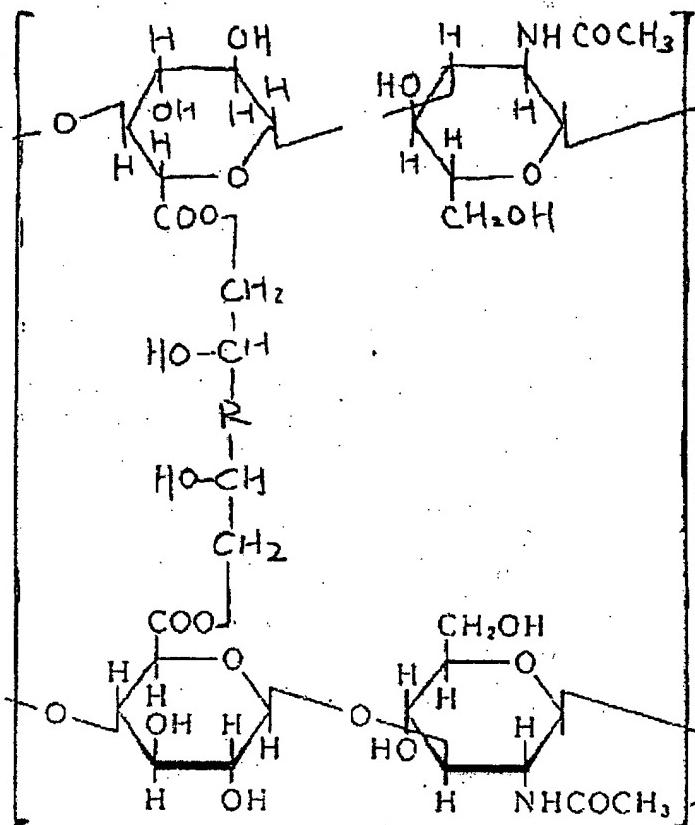
に膨潤率が大きければ、適用部分周囲の組織を圧迫してしまうおそれがあり、この点で従来のエポキシ化合物による架橋ヒアルロン酸は生体内適用にはあまり適さないものであった。本発明は前記従来技術の課題に鑑みなされたものであり、その目的はヒアルロン酸の架橋状態に検討を加え、水溶性及び膨潤度を調整するとともに、さらにその架橋ヒアルロン酸を用いて長期間にわたり一定濃度で薬物を供給することができる徐放性製剤を提供することにある。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】前記目的を達成するために本発明者らが鋭意検討を行なった結果、ヒアルロン酸のカルボキシル基同士を架橋すると、ヒアルロン酸の基本的な構造に影響を与えることなく、その水溶性、及び薬剤と複合化した場合の徐放性を調整しえることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本出願の請求項1記載の架橋ヒアルロン酸は、ヒアルロン酸残基のカルボキシル基が両末端エポキシ化合物系架橋剤により架橋され、下記一般式化2で示されることを特徴とする。

## 【0008】

## 【化2】



162 なお、上記化2中、Rはエポキシ化合物系架橋剤の架橋残部である。また、請求項2記載の架橋ヒアルロン酸は、ヒアルロン酸の全カルボキシル基に対し、架橋されたカルボキシル基が0.3%以上である水不溶性で且つ低膨潤性であることを特徴とする。請求項3記載の徐放性製剤は、前記架橋ヒアルロン酸と薬剤の複合体からなることを特徴とする。請求項4記載の徐放性製剤は、薬剤がヒアルロン酸のカルボキシル基とイオン的に相互作用し、複合体を形成し得る制癌剤であることを特徴とする。請求項5記載の塞栓剤は、前記架橋ヒアルロン酸からなることを特徴とする。請求項6記載の塞栓剤は、ヒアルロン酸のカルボキシル基とイオン的に相互作用する薬剤が複合化されたことを特徴とする。

【0009】本発明者らは、ヒアルロン酸のカルボキシル基同士をエポキシ化合物により架橋すれば、ヒアルロン酸の水に対する溶解性を調整し、更にその膨潤率をも適切に制御しえること、そして、該架橋ヒアルロン酸とイオン的に相互作用し複合体を形成し得る薬剤であれば、水不溶化した架橋ヒアルロン酸と複合化させることで、上述の課題を解決し得ることを見出し

た。すなわち、本発明は水不溶性架橋ヒアルロン酸と薬剤の複合体から成り、ヒアルロン酸骨格が酵素分解されるのに伴い、薬剤が放出されることを特徴とする顆粒状または微粒子状の徐放性製剤ないし塞栓剤を提供するものである。

【0010】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の出発原料に使用されるヒアルロン酸は通常ナトリウム塩となっているが、塩の種類は特に制約されない。また、分子量も同様に制限されない。ただし、あまり低分子量だと、以下の架橋反応がうまく進行しないため、分子量20万以上が好ましい。架橋反応は、ヒアルロン酸と、架橋剤である両末端エポキシ化合物と、中性～弱酸性触媒とを純水中に溶解したち、加熱により水分を蒸発乾固させることで反応を終了させる。架橋機構を図1に示す。同図より明らかのように、弱酸性下ではヒアルロン酸のカルボキシル基同士が両末端エポキシ化合物により架橋される。このときのヒアルロン酸濃度は、粘度が高過ぎると均一な溶液ができにくいため、通常1～3%で行なわれる。架橋剂量は、所望の架橋率となるように加えればよく、この架橋率の制御により生体内での分解速度が決定される。すなわち、高架橋率であるほど、生体内での酵素分解が遅くなる。

【0011】本反応はヒアルロン酸のカルボキシル基と架橋剤のエポキシ基が架橋反応するが、反応は水分の蒸発乾固に伴い進むため、分子間距離が極めて短い状態で効率よく架橋反応が進行する。更に静電的反発能を有するカルボキシル基が架橋点に参加することで、反発能を封鎖され、水膨潤性をほとんど失い、水不溶性となる。例えば、すべてのカルボキシル基が架橋点となつたときを架橋率100%とすると、架橋率0.3%以上で水不溶性となる。これに対し、従来のヒアルロン酸架橋法(特開昭60-233101、特開昭61-138601)の場合、この程度の架橋率では水溶性を示す。従来法では、塩基性の水溶液下でヒドロキシル基間を架橋反応させるため、架橋に参加する高分子鎖間の距離が長い状態で架橋され、更に、静電的反発を引き起こすカルボキシル基も無傷で残る。従って、水溶性または水膨潤性となってしまう。

【0012】本架橋法に用いられる両末端エポキシ化合物としては、ジグリシジルエーテル、ジグリシジルエステル、ジグリシジルアミン、ジグリシジルアンモニウム塩等のジグリシジル化合物が望ましい。勿論、グリシジル基が3個以上でもよい。これらの中で、グリシジルエーテル化合物は最も入手しやすく、安価であるが、具体例としては、エチレングリコールジグリシジルエーテル、ブロビレングリコールジグリシジルエーテル、ポリプロピレンジグリシジルエーテル、グリセリンジグリシジルエーテルなどが挙げられる。また、前述したように、これらのエポキシ系架橋剤は、他の架橋剤と比べて生体内での安全性も高いことが報告されている。ヒアルロン酸のカルボキシル基と両末端エポキシ化合物との反応における適当な触媒として、第4級アンモニウム塩類、第3アミン類、リン酸塩類、イミダゾール化合物類等を挙げることができる。しかし、触媒そのものの毒性、および弱塩基性下でもヒアルロン酸鎖は分解されやすい事から考えて、中性～弱酸性の安全な無機触媒を用いることが好ましい。

【0013】例えば、リン酸第一アンモニウム、リン酸第一ナトリウム、リン酸第一カリウムなど、水溶液のpHが4～7のリン酸塩が好適である。触媒としての濃度は、溶媒である純水100mlに対し、2mg以上あればよく、通常、20mg程度で充分である。加熱により水分を蒸発乾固させながら架橋反応を進行させるが、こうして得らるフィルム状架橋ヒアルロン酸は、次に粉碎し、平均粒径をミリ以下とし、次工程の薬物との複合化に移される。このとき、平均粒径を特に制約する必要はないが、粒径の小さい方が次工程での薬剤との複合化が短時間で済むため、好適である。複合化の対象となる薬物は、架橋ヒアルロン酸のカルボキシル基とイオン的に相互作用して、複合体を形成するものであれば何でもよいが、特に、制癌剤は患部に長時間存在し続けることで、薬理効果の大幅な改善を望めるため、酵素分解に応じて薬剤を徐放する本発明の徐放性製剤は効果的である。

【0014】イオン的に相互作用して複合体を形成する制癌剤としては、その化学構造内に塩基性イオンを持つことが必要であるが、具体的には、塩酸ニムスチン、塩酸アンシタピン、塩酸ダウノルビシン、塩酸ドキソルビシン、塩酸

ブレオマイシン、硫酸ブレオマイシン、硫酸ペプロマイシン、塩酸アクラルビシン、塩酸エピルビシン、硫酸ビンプラスチン、硫酸ビンクリスチン、硫酸ビンテシンなどが挙げられる。制癌剤と架橋ヒアルロン酸粉末との複合化は、本質的にはイオン的相互作用による化学吸着に起因している。従って、複合化できる量比はその化学吸着量に直接関係し、制癌剤の種類により異なる。

**【0015】**複合体を調製するには、まず制癌剤の水溶液に架橋ヒアルロン酸を分散し、化学吸着が平衡に達したところで静置し、沈殿してきた複合体を濾別、乾燥し、それを粉碎して顆粒状または微粒子状複合体を得る。使用に際しては、通常の注射剤に要求される条件を満足する必要がある。複合化する制癌剤の安定性にもよるが、生理食塩液等の等張液に分散して用いる用時分散タイプの製剤が好ましい。制癌剤の放出はその複合化率(=制癌剤量/架橋ヒアルロン酸量)による。複合化は純粋中で行なわれるが、放出は生理的条件下で起こる。したがって、純水条件下における吸着平衡から生理的条件下における吸着平衡に移行し、制癌剤の純水中における化学吸着量が、生理的条件下における平衡吸着量よりも少なければ、制癌剤の放出は複合体中のヒアルロン酸の酵素分解速度と等しく、逆に多ければ、それに対応した制癌剤が一時に放出された後、酵素分解速度に対応した速度で制癌剤が放出される。このような一時的な放出は、血中濃度を早く薬物有効濃度に引上げる際、有効な手段として使われる。

**【0016】**本製剤の投与場所は、ヒアルロン酸分解酵素の存在するところであれば、どこであってもよく、徐放性を有する安全な生体吸収性製剤として投与可能である。事実、ヒアルロン酸分解酵素は、肝臓、腎丸を始め、肺、腎、関節液等生体に広く分布しているため、これらの臓器で有効に使用できる。このように本製剤は、酵素によるヒアルロン酸の分解反応を利用して薬剤を放出する製剤のため、従来のカプセル型製剤のように粒子径や粒径の影響を受けることはない。

**【0017】**また、本発明の徐放性製剤は粒径によっては制癌剤の徐放も兼ね備えた塞栓剤として有効である。塞栓療法は、切除不能な腫瘍に対し、その支配動脈に血管内塞栓剤を投与することで栄養を遮断する療法として広く知られている。制癌剤と組合せて、腫瘍内の制癌剤濃度を高く維持することで、良好な結果が得られていることも報告されている(日外会誌、'92、187、1991)。同目的で本発明の徐放性製剤を用いれば、徐放と塞栓を一つの製剤で同時に可能ならしめることができる。しかも本発明の徐放性製剤は生体吸収性であるため、塞栓療法として一部で行なわれているバルーンを用いる療法のように術後取り出す必要もない。塞栓療法は、支配動脈にカテーテルを挿入できる腫瘍であれば特に限定されるものではないが、現在この塞栓療法がもっと多く行なわれている腫瘍は、切除不能な肝癌である。しかし、現在の進歩した医療技術ではほとんどの臓器の動脈にカテーテル挿入することが可能となっており、今後一層、本療法の適用が拡大されると予想される。

**【0018】**

**【実施例】**以下、本発明の具体的な実施例を詳細に説明する。なお、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

#### ¶74 実施例1

¶75 純水200mlに10%第一リン酸アンモニウム液0.4mlづつ加えた液を4個用意し、それぞれに2%グリセリンジグリシルエーテル水溶液を20, 5, 1, 6.7, 0.62g加えた後、各水溶液に分子量約200万のヒアルロン酸を2gづつ溶解させた。次に、それらの溶解液をシャーレに移し、80°Cの空気循環式恒温槽に10時間放置し、架橋反応を行なわせた。こうして得られたヒアルロン酸架橋フィルムを50%エタノール溶液で洗浄、乾燥、粉碎後、篩分することで100μ以下とした。これらはいずれも水不溶性で、水中での膨潤もほとんど観察されたなかった。なお、これら架橋ヒアルロン酸微粉末の架橋率は、添加した架橋剤の全量がヒアルロン酸のカルボキシル基と反応すると仮定して算出した。架橋度100%とはすべてのカルボキシル基が架橋点になっていることを意味する。上の添加量の場合、架橋率はそれぞれ59.3, 14.8, 4.9, 1.8%に相当する。

**【0019】**

実施例1の架橋率の異なる4種の架橋ヒアルロン酸微粉末を、各10mgづつ試験管に採り、これに100ユニットのヒアルロニダーゼ(天野製薬)を含むpH6.0の酢酸緩衝液4mlを加え、攪拌しながら50°Cに保持した。遊離ヒアルロン酸量(分解率)の経時変化を調べるため、経時で0.45μメンプランフィルター濾過しながらサンプリングし、その中に溶解しているヒアルロン酸量をカルバゾール・硫酸法で比色定量した。結果を表1に示す。表1より、架橋率が高ければ高いほど、酵素分解しにくいことが理解される。また、架橋率を制御することで分解速度も制御できることが示唆される。

【表1】

¶78 架橋率 59.3 14.8 4.9 1.8

¶79

¶80 0.5時間後 1.0 1.5 2.2 2.3

¶81 1.1.6 2.8 4.5 4.8

¶82 2.2.5 6.0 12.2 13.0

¶83 4.3.6 12.1 25.6 27.0

¶84 7.4.5 19.7 45.1 40.3

¶85 10.5.9 31.3 64.6 60.9

¶86 24.12.5 56.0 81.3 91.5

¶87 36.17.9 63.5 86.7 90.3

¶88 48.26.2 72.5 96.3 98.7

¶89

#### 【0020】本実施例にかかる架橋ヒアルロン酸微粉末のうち、架橋率59.3%と

1.8%の2試料について、兎を用いた移植試験を行なった。各試料を10倍量の生理食塩液に分散させ、その各分散液0.5mlを体重2.5kgの健康な雄兎の脊柱を挟む両側に3点づつ皮下注射した。1週間後、兎を麻酔死させ、脱血させた後、試料を囲む組織を拡大鏡を用いて検査した。その結果、架橋率59.3%の試料の場合には、注入した架橋ヒアルロン酸微粉末がほぼ残存していたが、架橋率1.8%の場合にはその痕跡は認められず、生体内に吸収されていた。また、両試料とも出血、被包形成等の以上は認められなかった。このことから、本架橋ヒアルロン酸微粉末は安全性が高く、生体吸収性にも優れていることが理解される。

#### 【0021】実施例2

¶92 塩酸ドキソリビシン濃度が200~5000ppmの水溶液2mlに、実施例1の架橋ヒアルロン酸微粉末5mgを加え、25°Cで3時間インキュベーションした。これを遠心分離後、上澄液中の塩酸ドキソリビシン量を479nmにおける吸光度測定で定量し、初期濃度との差から架橋ヒアルロン酸微粉末への吸着量を調べた。その吸着等温曲線を図2に示した。同図から、塩酸ドキソリビシンは架橋率に関係なく、架橋ヒアルロン酸と化学吸着していることが示唆される。さらにこうして化学吸着した塩酸ドキソリビシンは、周囲の環境をpH3以下にすると、ふたたび脱離することも確認した。

#### 【0022】実施例3

¶94 塩酸ドキソリビシン10mgを10ccの純水に溶解し、これに実施例1で調製した架橋率4.9%のヒアルロン酸微粉末50mgを分散し、化学吸着させた後、上澄み液を捨て、真空乾燥した。乾燥品を再び粉碎後、細かい分けし、平均粒径を100μ以下とした。こうして調製した塩酸ドキソリビシン・架橋ヒアルロン酸複合体微粉末50mgを、生理食塩液20mlに分散し、37°C、100ストローク/分で振盪した。この時放出されてくる塩酸ドキソリビシン量を吸光度測定により定量した。図3は放出される塩酸ドキソリビシンの濃度の経時変化を示す。約130分経過したところで平衡に達したが、ここでヒアルロニダーゼ(天野製薬)1000ユニットを加え

たところ、再び放出が始り、220分後には全量放出した。

#### 【0023】実施例4

『96 架橋率が2, 5, 10%となるようにエチレングリコールジグリシジルエーテルを加えて調製した架橋ヒアルロン酸を実施例1と同様の操作で微粉末とした。その1000mgをそれぞれ、塩酸ドキソルビシン10mgを含む水溶液中に分散後、遠心分離し、真空乾燥した。100μ以下に粉碎後、その50mgを、500ユニットのヒアルロニダーゼを含む10mlの生理食塩液に分散し、37℃、100ストローク／分で振盪した。この時、上澄み液中に放出される塩酸ドキソルビシン量を経時で吸光度測定により定量した。図4にその結果を示す。放出される塩酸ドキソルビシンは、初期に有効濃度まで一時に放出され、その後一定の放出速度を保っている。しかも、その放出速度は高架橋率であるほど遅くなっている。なお、ヒアルロニダーゼを含まない対照試験では、初期に一時の薬剤放出が観測されるのみで、その後は放出されなかった。

#### 【0024】実施例5

『98 実施例7の塩酸ドキソルビシンの代りに塩酸ブレオマイシンを用いる以外は、実施例7と同様に試験を行なった。結果はほとんど同じ挙動を示した。

#### 【0025】実施例6

『100 純水50mlに10%第一リン酸アンモニウム液0.2mlずつ加えた液を8個用意し、それぞれに2%エチレングリコールジグリシジルエーテル水溶液を1.76, 0.88, 0.35, 0.15, 0.060, 0.030, 0.015, 0.008g加えた後、各水溶液に分子量約160万のヒアルロン酸を0.5gずつ溶解させた。次に、それらの溶解液をシャーレに移し、100℃の空気循環式恒温槽に5時間放置し架橋反応させた後、70%エタノール水溶液で洗浄後、乾燥し、ヒアルロン酸架橋フィルムを得た。こうして得たヒアルロン酸フィルムの架橋率は、上から順に59, 30, 12, 4, 9, 2, 0, 1, 0, 0.5, 0.25%であったが、架橋率0.25%のフィルムを除いて、いずれも水不溶性であったため、純水及び生理食塩水で膨潤率測定に供した。測定の方法は、まず各フィルムから1.5×1.5cmを切り出し、読み取り顕微鏡(オリパス製)及び膜厚計(東京精密)を用いて、縦×横×膜厚を測定後、25℃の純水または生理食塩水に膨潤平衡に達するまで浸漬した。次に、その膨潤平衡に達したフィルムを液から取り出し、表面の水滴を切った後、再び縦×横×膜厚を測定した。この結果を元に浸漬前後の体積膨潤比を算出し、プロットしたのが図5である。純水中と生理食塩水中での膨潤比に大差はなく、架橋率の低下とともに膨潤比が上昇している。しかし、水不溶性を示した架橋率0.5%のフィルムでも膨潤比は4を越えず、膨潤能は際立って低いことが理解される。このように本発明にかかる架橋ヒアルロン酸は、水不溶性であるばかりでなく、水膨潤度も低いため、生体内に埋め込み或いは塞栓剤として用いられた場合にも、周囲の組織を必要以上に圧迫してしまうようなことはない。

#### 【0026】実施例7

『102 実施例1に準じて調製した架橋率1.8%と100%の架橋ヒアルロン酸微粉末について、実施例2と同様に塩酸ドキソルビシンの吸着等温線を調べた。結果を図6に示す。塩酸ドキソルビシンは、架橋率1.8%の架橋ヒアルロン酸粉末に対しては化学吸着するが、架橋率100%の粉末には化学吸着せず、物理吸着のみ観察される。この差異は、本発明による架橋反応がヒアルロン酸のカルボキシル基間の架橋であることに起因している。すなわち、架橋率100%の粉末の場合、すべてのカルボキシル基が架橋点になっているため、フリーのカルボキシル基は残っておらず、その結果として塩酸ドキソルビシンは化学吸着できず、単に物理吸着のみ観測されたと考えられる。

#### 【0027】

【発明の効果】以上説明したように本発明にかかる架橋ヒアルロン酸は、カルボキシル基同士を架橋することとしたので、水不溶性及び低膨潤性とすることができます。そして、該架橋ヒアルロン酸に薬剤を複合化させ徐放性製剤とした場合、生体内に投与されると、ヒアルロン酸の酵素分解に伴い、薬剤を

徐々に放出することができる。さらに、本発明にかかる架橋ヒアルロン酸を塞栓剤として用いた場合、他組織に必要以上の圧迫を加えるようなことはない。

【図面の簡単な説明】

- 【図1】本発明にかかる架橋ヒアルロン酸の架橋状態の説明図である。
- 【図2】実施例2において、アドリアマイシン(塩酸ドキソルビシン)の架橋ヒアルロン酸粉末に対する純水、25°Cでの吸着等温線である。
- 【図3】実施例3にかかる徐放性製剤から放出されたアドリアマイシン量の経時変化の説明図である。
- 【図4】実施例4にかかる徐放性製剤から放出されたアドリアマイシン量の経時変化を示す説明図である。
- 【図5】実施例6で調製した架橋ヒアルロン酸フィルムの純水及び生理食塩水中、25°Cでの体積膨潤比の架橋率依存性の説明図である。
- 【図6】実施例7で測定した塩酸ドキソルビシンの架橋ヒアルロン酸粉末(架橋率1.8%:▲、100%:●)に対する純水、25°Cでの吸着等温線である。

¶112【代表図面】【図1】【図2】【図3】【図4】【図5】【図6】

¶113

¶114

【手続

補正書】

【提出日】平成5年10月21日

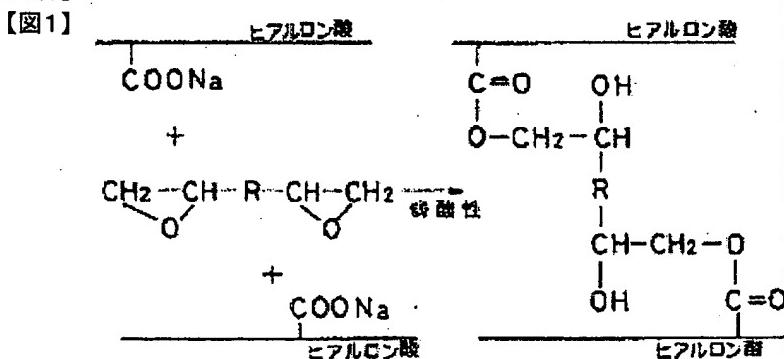
【手続補正1】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図1

【補正方法】変更

【補正内容】



【手続補正2】

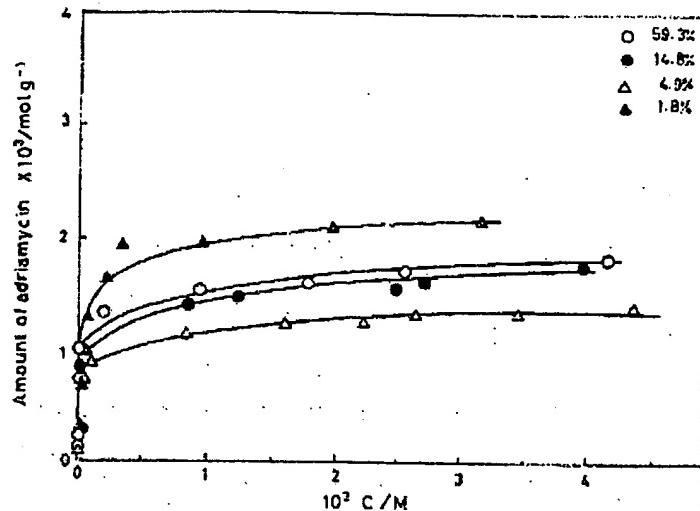
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図2

【補正方法】変更

【補正内容】

【図2】



【手続補正3】

### 【補正対象書類名】明細書

### 【補正対象項目名】請求項1

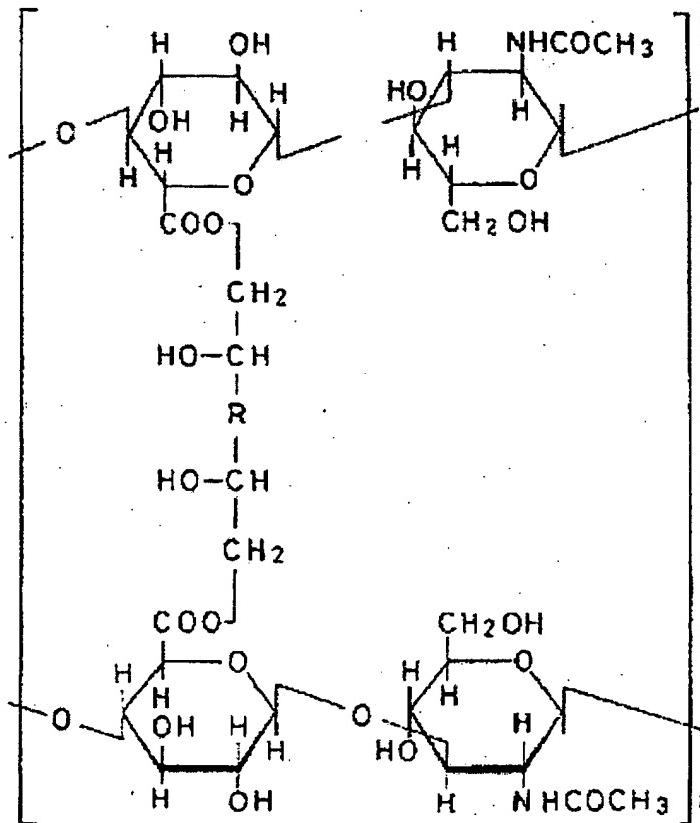
### 【補正方法】変更

### 【補正内容】

【請求項1】ヒアルロン残基のカルボキシル基が両末端エポキシ化合物系架橋剤により架橋された、下記一般式化1で示される架橋ヒアルロン酸。

**【化1】**

1135



¶136 なお、上記化1中、Rはエポキシ化合物系架橋剤の架橋残部である。

【手続補正4】

### 【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

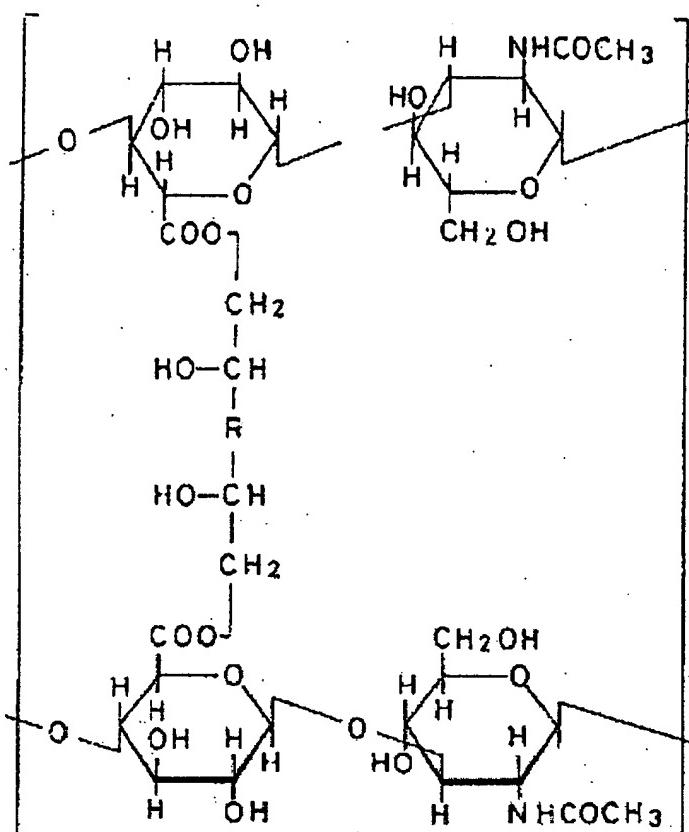
#### 【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0008】

【化2】

¶144



¶145 なお、上記化2中、Rはエポキシ化合物系架橋剤の架橋残部である。また、請求項2記載の架橋ヒアルロン酸は、ヒアルロン酸の全カルボキシル基に対し、架橋されたカルボキシル基が0.3%以上である水不溶性で且つ低膨潤性であることを特徴とする。請求項3記載の徐放性製剤は、前記架橋ヒアルロン酸と薬剤の複合体からなることを特徴とする。請求項4記載の徐放性製剤は、薬剤がヒアルロン酸のカルボキシル基とイオン的に相互作用し、複合体を形成し得る制癌剤であることを特徴とする。請求項5記載の塞栓剤は、前記架橋ヒアルロン酸からなることを特徴とする。請求項6記載の塞栓剤は、ヒアルロン酸のカルボキシル基とイオン的に相互作用する薬剤が複合化されたことを特徴とする。

¶146

¶147

¶148 フロントページの続き

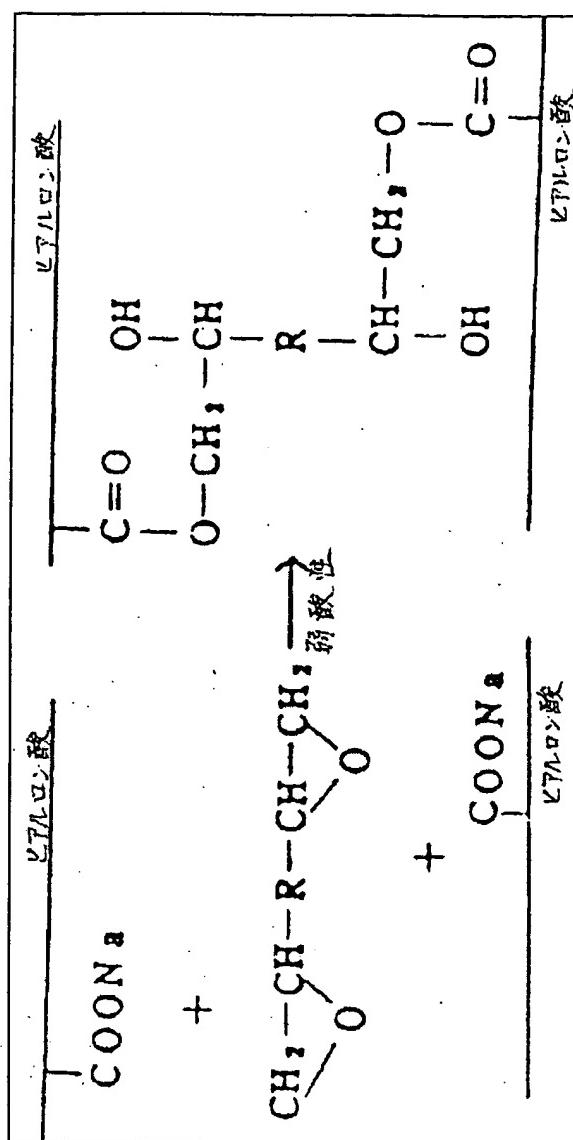
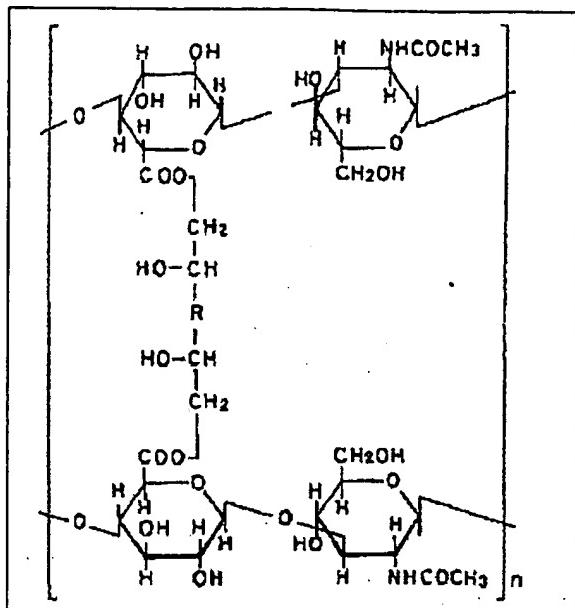
¶149

¶150(72)発明者 内田 賢

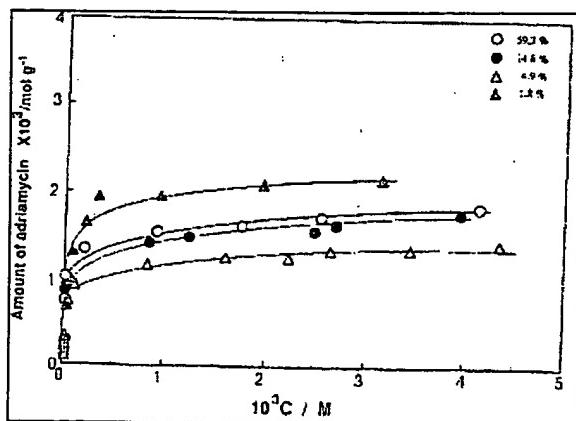
¶151 東京都練馬区氷川台4-39-21-104

【代表図面】

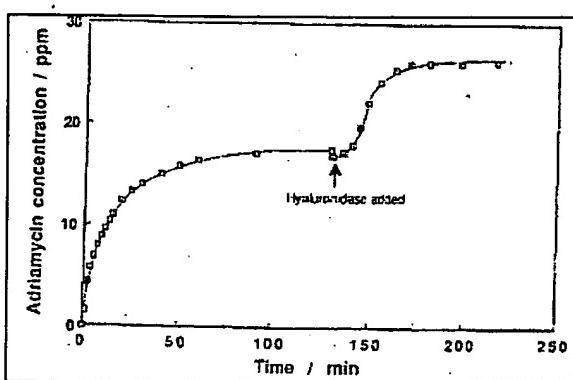
【図1】



【図2】

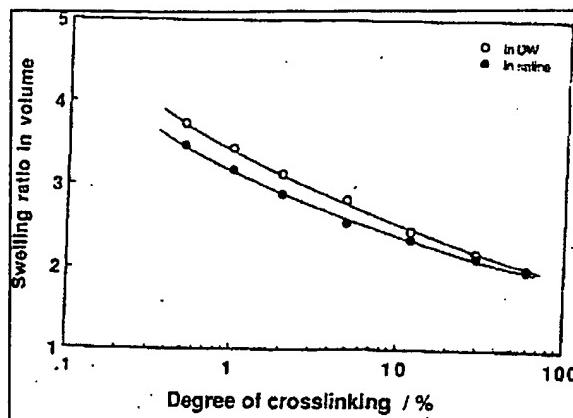
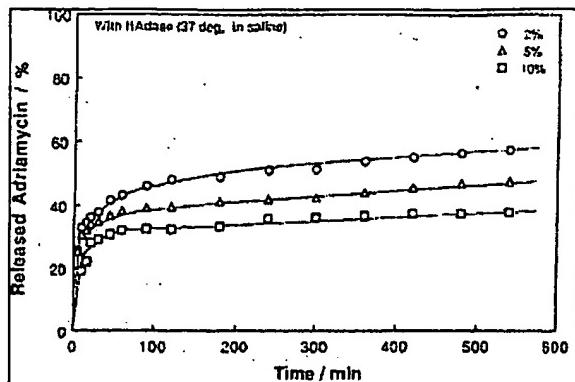


【図3】



【図4】

【図5】



【図6】

